

Mechanisms of neuronal loss in aging and Alzheimer's disease

Citation for published version (APA):

Rutten, B. P. F. (2005). *Mechanisms of neuronal loss in aging and Alzheimer's disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20051021br>

Document status and date:

Published: 01/01/2005

DOI:

[10.26481/dis.20051021br](https://doi.org/10.26481/dis.20051021br)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

To prevent or treat neuronal alterations and neuronal loss in aging and Alzheimer's disease (AD), it is crucial to identify the underlying molecular and cellular mechanisms. Although our knowledge about these mechanisms is still rather limited, recent findings have provided novel insights and envision potential candidates for intervention. The findings of my thesis have contributed to this development. In **Chapter 1**, I describe background information on the current knowledge on the aging process in the brain and on the molecular and cellular events that are involved in the pathogenesis of AD. In addition, I discuss current issues on the mechanisms underlying neuronal loss in aging and AD and on potential strategies to attenuate these mechanisms. Based on these issues, I have formulated several hypotheses which were tested in my PhD research. The studies which tested my hypotheses are described in Chapters 2 to 9.

A major prerequisite for performing adequate investigations is that the methodology used is appropriately measuring the parameter under investigation. In **Chapter 2**, I describe that quantitative neuromorphologic analyses on the brain should be carried out on sets of sections systematically and randomly sampled to span the entire brain region of interest and not on single sections. These findings resulted into new standards for quantitative neuromorphological investigations, based on which I carried out all further investigations. In **Chapter 3**, I speculate (*on the basis of a review of the literature*) on the existence of a potential, previously unknown, inverse association in the aging brain between types of neuron showing a accumulation of nuclear (n) DNA damage and types of neuron showing an age-related reduction in numbers. This speculation was tested for the first time in a controlled study (described in Chapter 4) on one mammalian species, i.e., a cohort of aging mice of a specific strain. In **Chapter 4**, I describe this study in which I showed that types of neuron in the mouse brain with age-related decline in the rate of nDNA repair showed accumulation of unrepaired nDNA damage during aging without age-related loss of neurons. In contrast, types of neuron without an age-related decline in the rate of nDNA repair showed no accumulation of unrepaired nDNA damage during aging but an age-related loss of neurons. These findings indicate that the aging process in the brain affects certain types of neuron differently than others. In addition, these findings suggested that attenuation of age-related accumulation of nDNA damage in neurons may be reached through several strategies.

One of the best documented sources for damage during aging is oxidative stress (the increased production of highly reactive oxygen molecules). In **Chapter 5**, current evidence for a central

role of oxidative stress in Alzheimer's disease and for the value of antioxidants (molecules that scavenge these reactive molecules) in preventing or treating Alzheimer's disease is critically discussed. In **Chapter 6**, I describe the study which was designed to investigate the effects of an upregulation of an endogenous antioxidant (through transgenic overexpression of superoxide dismutase) and of a reduction in dietary caloric intake. The effects were studied by investigating the amount of DNA damage in neurons and on the total number and size of neurons in the hippocampus during aging. I chose to investigate the hippocampus as this brain region is known to be highly vulnerable during aging. I found that life-long upregulation of superoxide dismutase did not have any effect on the amount of DNA damage in neurons and on the total number and size of neurons in the hippocampus during aging. In contrast, a dietary reduction in caloric intake resulted in an extension of life span, a reduction in the amount of DNA damage, a reduced volume of the hippocampus, and attenuation of neuronal shrinkage during aging.

Although AD is the most common age-related mental health disorder, very little is known about the molecular and cellular events underlying neuronal alterations in AD. The most striking neuronal alterations in AD are loss of neurons and synapses. So far, there is no available treatment which modifies the molecular and cellular processes involved in AD pathogenesis. Several candidate molecules have recently been proposed to be responsible for loss of neurons and synapses in AD. The ' β -amyloid-hypothesis' is the most commonly accepted hypothesis. This hypothesis poses that aggregations of β -amyloid protein result into damage in the brains of people with Alzheimer's disease. Loss of neurons and synapses (connections between neurons) are the most important forms of damage and these parameters can be investigated with modern techniques. A way to investigate numbers of synapses is quantification of the number of synaptophysin-immunoreactive presynaptic boutons [SIPB]). Transgenic animals (animals whose DNA is altered so that they produce a certain molecule in a higher amount than normal animals do) are very useful to investigate the effects of these molecules on living organisms. With the help of several transgenic mouse models, I have rigorously assessed the effects of several of the proposed candidates on the numbers of neurons and synapses in the hippocampus during aging.

In **Chapters 7, 8 and 9** I describe that

- a) overexpression of the C99 terminal fragment of human Amyloid Precursor Protein (APP) did not result in age-related loss of hippocampal neurons or synaptophysin-immunoreactive presynaptic boutons within the hippocampus,
- b) overexpression of human mutant APP did not result in age-related loss of SIPB in the hippocampus,
- c) overexpression of human mutant Presenilin 1 (PS1) resulted in age-related loss of SIPB in hippocampal area CA1-2 but not in age-related loss of hippocampal neurons,

- d) overexpression of both human mutant APP and human mutant PS1 resulted in age-related formation of extracellular A β aggregations, which were associated with age-related hippocampal neuron loss and with disturbances of synaptic integrity,
- e) mechanisms other than extracellular A β aggregations contributed significantly to age-related hippocampal neuron loss in mice that overexpress both human mutant APP and human mutant PS1.

Together, these findings have prompted for modifications of the original ' β -amyloid hypothesis' as they indicated that certain molecules are much more likely to be held responsible for loss of neurons and synapses in the hippocampus of patients with AD than other molecules. By defining the molecules responsible for neuronal loss, these findings may initiate the development of novel treatment strategies to prevent or treat this devastating disease. In **Chapter 10**, I summarize the major results of my thesis and discuss them in light of the current literature. Furthermore, possible avenues for future research are discussed.

Samenvatting

Om veranderingen en verlies van materiaal in zenuwcellen (i.e. neuronen) tijdens veroudering en bij de ziekte van Alzheimer te voorkomen of te behandelen, is het cruciaal om de onderliggende moleculaire en cellulaire mechanismen te identificeren. Ondanks de beperkte kennis over deze mechanismen, hebben recente bevindingen geleid tot nieuwe inzichten en liggen er potentiële kandidaten voor interventie in het verschiet. De bevindingen zoals beschreven in dit proefschrift hebben bijgedragen aan deze ontwikkeling. In **Hoofdstuk 1** beschrijf ik achtergrond informatie over de huidige kennis van het verouderingsproces in de hersenen en van de moleculaire en cellulaire gebeurtenissen die betrokken zijn bij de pathogenese van de ziekte van Alzheimer. Verder bespreek ik huidige discussie punten over de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuronaal verlies bij veroudering en bij de ziekte van Alzheimer. Met deze punten als uitgangsbasis heb ik verschillende hypothesen geformuleerd die ik tijdens mijn promotieonderzoek heb getest. In Hoofdstukken 2 tot en met 9 bespreek ik de studies waarin ik de hypothesen heb getest.

Een belangrijke voorwaarde om adequaat onderzoek te doen, is een correcte meetmethode om de parameter van interesse op een juiste manier te onderzoeken. In **Hoofdstuk 2** beschrijf ik dat kwantitatieve neuromorfologische meetmethoden voor het brein moet worden uitgevoerd met series van hersencoupees die op een systematische doch willekeurige manier worden verzameld en die de gehele hersenregio onder analyse omvatten, en niet met een enkele hersencoupe door die hersenregio. Op basis van deze bevinding heb ik al mijn verdere neuromorfologische onderzoeken uitgevoerd met series van hersencoupees die op een systematische doch willekeurige manier werden verzameld en die de gehele hersenregio onder analyse omvatten. In **Hoofdstuk 3** speculeer ik (op basis van een analyse van de literatuur) over het mogelijke bestaan van een vooralsnog onbekende, omgekeerde associatie in de hersenen tussen typen neuronen die DNA schade ophopen in de celkern tijdens veroudering en typen neuronen die verminderen in aantal tijdens veroudering. Deze speculatie werd voor de eerste keer getest in een gecontroleerde studie met één diersoort, muizen van een bepaalde stam. In **Hoofdstuk 4** beschrijf ik deze studie waarin ik heb aangetoond dat, tijdens het verouderingsproces van deze muizen, de typen neuronen met een vermindering van de snelheid van DNA reparatie een ophoping van ongerepareerde DNA schade hadden in hun celkern zonder dat het totale aantal neuronen significant verminderde. Andersom had een ander type neuron geen vermindering van de snelheid van DNA reparatie en geen ophoping van ongerepareerde DNA schade in de celkern maar wel een significante vermindering van het aantal neuronen. Deze bevindingen laten zien

dat het verouderingsproces bepaalde typen neuronen anders beïnvloedt dan andere. Eén van de best gedocumenteerde bronnen voor schade tijdens veroudering is oxidatieve stress (i.e. de verhoogde productie van snel-reactieve zuurstof moleculen). In **Hoofdstuk 5**, bespreek ik de centrale rol van oxidatieve stress bij de ziekte van Alzheimer en de waarde van antioxidanten (i.e. moleculen die deze snel-reactieve moleculen kunnen wegvangen) om de ziekte van Alzheimer te voorkomen of te behandelen. In **Hoofdstuk 6** beschrijf ik de studie die ik heb uitgevoerd om de effecten van een verhoging van een endogene antioxidant (door transgene overexpressie van superoxide dismutase) en van een beperking van calorieën in de voeding op de hoeveelheid DNA schade in neuronen en op het totale aantal en de grootte van neuronen in de hippocampus tijdens veroudering te onderzoeken. De hippocampus werd gekozen omdat deze hersenregio erg kwetsbaar is tijdens veroudering. Ik heb gevonden dat levenslange verhoging van superoxide dismutase geen effect had op de hoeveelheid DNA schade en op het totale aantal en de grootte van neuronen in de hippocampus tijdens veroudering. Tegengesteld hieraan resulteerde een beperking van calorieën in de voeding tot een verlenging van de levensduur, een vermindering van de veroudering-gerelateerde ophoping van DNA schade, een vermindering van het volume van de gehele hippocampus en een mindere veroudering-gerelateerde verkleining van neuronen. Dus, beperking van calorieën heeft meer effecten op de gemeten veroudering-gerelateerde parameters dan de verhoging van het endogene antioxidant.

Ondanks dat de ziekte van Alzheimer de meest voorkomende veroudering-gerelateerde stoornis is van de geestelijke gezondheid, is slechts weinig bekend over de moleculaire en cellulaire gebeurtenissen die ten grondslag liggen aan de neuronale veranderingen bij de ziekte van Alzheimer. Tot nu toe is er geen behandeling beschikbaar die de moleculaire en cellulaire gebeurtenissen die in de pathogenese van de ziekte van Alzheimer betrokken zijn, verandert. De laatste jaren werden verschillende kandidaat moleculen als verantwoordelijk gesteld voor de schade in de hersenen bij mensen met de ziekte van Alzheimer. De 'β-amyloid-hypothese' is de meest gangbare hypothese. Deze stelt dat ophopingen van het β-amyloid eiwit leiden tot schade in de hersenen bij mensen met de ziekte van Alzheimer. Verlies van neuronen en van synapsen (verbindingspunten tussen neuronen) zijn hierbij belangrijke vormen van schade. Deze parameters kunnen worden onderzocht met moderne meettechnieken. Een methode om het aantal synapsen vast te stellen is het quantificeren van het aantal synaptophysine-immunoreactieve presynaptische boutons (SIPB). Met gebruik van transgene dieren (dieren waarvan het DNA zodanig gemanipuleerd is dat ze een bepaald molecuul meer aanmaken dan normale muizen) is het mogelijk om de effecten van (over)expressie van bepaalde moleculen op levende organismen te bestuderen. In mijn promotieonderzoek heb ik de effecten onderzocht van verschillende van de voorgestelde kandidaat-moleculen op het aantal neuronen en synapsen in de hippocampus tijdens veroudering van deze dieren:

In **Hoofdstukken 7, 8 en 9** beschrijf ik dat:

- a) transgene overexpressie van het C99-terminale fragment van het humane amyloid-precursor-protein (APP) geen verlies van hippocampale neuronen of SIPB tot gevolg had,

- b) transgene overexpressie van humaan gemuteerd APP niet leidde tot verlies van SIPB in de hippocampus tijdens veroudering,
- c) transgene overexpressie van het humane gemuteerde preseniline 1 (PS1) leidde tot verlies van SIPB in een speciaal gebied (het CA1–2 gebied) van de hippocampus maar niet tot verlies van hippocampale neuronen tijdens veroudering,
- d) transgene overexpressie van het humane gemuteerde APP en PS1 leidde tot de vorming van extracellulaire ophopingen van het β -amyloid eiwit, die verband hielden met verlies van neuronen, verstoringen van de synaptische integriteit en verlies van SIPB in de hippocampus tijdens veroudering
- e) andere mechanismen dan de extracellulaire ophopingen van β -amyloid significant bijdroegen aan verlies van neuronen in de hippocampus tijdens veroudering van transgene muizen voor APP en PS1.

Gezamenlijk hebben mijn bevindingen uitgewezen dat verlies van neuronen en synapsen in de hippocampus bij mensen met de ziekte van Alzheimer waarschijnlijk wordt veroorzaakt door bepaalde moleculen en hoogst waarschijnlijk niet door andere, hetgeen tot modificaties van de originele ‘ β -amyloid hypothese’ heeft geleid. Bovendien kunnen mijn bevindingen fungeren als een basis voor de ontwikkeling van nieuwe strategieën om deze verwoestende ziekte te voorkomen of te behandelen. In *Hoofdstuk 10* vat ik de voornaamste bevindingen van mijn promotieonderzoek samen en bediscussieer ik deze in het licht van de huidige literatuur. Verder bespreek ik mogelijke richtingen voor toekomstig onderzoek.